

Aus dem Kinderspital Basel
(Direktor: Prof. Dr. A. Hottinger).

Zur Fraktionierung und elektrophoretischen Untersuchung der Milcheiweisse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Jerzy J. Sikorski

Inowroclaw (Polen)



Basel 1958



VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Pro
A. Hottinger,

Tag der Promotion: 31. Januar 1958.

Sonderdruck aus «Annales Paediatrici» Vol. 191, No. 3.

In den letzten Jahren haben sich die Methoden zur Untersuchung der Eiweißkörper stark geändert. Während früher die Betonung mehr auf der Untersuchung der einzelnen Aminosäuren und deren prozentualem Anteil in den einzelnen Eiweißen lag, steht heute die Untersuchung von Eiweißgruppen im Vordergrund. In diese Gruppen werden Eiweiße ähnlicher Struktur, erkennbar durch ähnliches chemisches oder physikalisches Verhalten, zusammengefaßt. Die hauptsächlichsten Untersuchungsmethoden zur Erforschung dieser Probleme sind Trennung durch Ultrazentrifuge, Elektrophorese und Fällung mit anorganischen Salzen, Alkohol u. ä. in verschiedener Konzentration. In der medizinischen Praxis haben sich besonders die zwei letzten als einfache und relativ billige Methoden fest eingebürgert. Heute gehören die Fällungsreaktionen und die Elektrophorese der Serumproteine zu den gebräuchlichsten Hilfsmitteln der medizinischen Diagnostik.

Darüber hinaus haben sich die Elektrophorese und Fällungsreaktionen auch bei der Untersuchung anderer Körpereiw eiße als brauchbare Methode erwiesen. Bei der Frauenmilch z. B. hoffte man, durch diese Methoden mehr über die Zusammensetzung dieser wichtigen Nahrungsflüssigkeit zu erfahren.

Im Jahre 1922 konnte *P. F. Howe* erstmalig durch eine fraktionierende Fällung mit Na_2SO_4 die Milchglobuline in drei Gruppen einteilen: Euglobuline, Pseudoglobuline I u. II (1). Etwas später trennte *Palmer* nach der gleichen Methode die Albumine in Albumin: A, B u. C (2). Damit waren die Haupteiweißgruppen des Laktoserums definiert.

Andere Autoren haben verschiedene Fällungsreaktionen auch zur Unterscheidung von Kuh- und Frauenmilch verwendet (*J. Ivady, M. Koltay* [3]). Als die elektrophoretische Untersuchungsmethode erfunden und verwendet wurde, erwies sie sich ebenfalls als ausgezeichnetes Hilfsmittel zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten, u. a. der Milch. *Hostettler* (4), *De Luca* (5) u. a. haben elektrophoretisch drei Caseinfraktionen differenziert. *Narducci* (6) unterscheidet in der entrahmten Milch: 1. Immunglobulin-Komplex, 2. Casein-Komplex 1 bis 3 Fraktionen, 3. Lactoglobulin-Komplex aus 2 Fraktionen. *Biserte* (7) unterscheidet 3 Albumin- und eine Globulin-Fraktion. *Heyndrick* (8) ermittelte 8 Fraktionen: A bis H. *Schäfer* (9) fand 4—5 Zacken und deutete sie als 2—3 Globuline, 1 Casein- und 1 Albumin-Zacke.

Allerdings ist der Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Autoren schwierig, da die Untersuchungen einerseits bei verschiedenem pH sowie andererseits teils als Papier- und teils als Tiselius-Elektrophoresen durchgeführt wurden.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, in der papierelektrophoretischen Kurve der entrahmten Frauenmilch die von *Howe* und *Palmer* beschriebenen Albumin- und Globulinfraktionen zu lokalisieren.

Methoden.

Elektrophorese: Papier: Whatmann Nr. 1. Michaelis-Veronalpuffer pH 8,6, Potential 0,1. 110 Volt, 18 Stunden. Färbung: Amidoschwarz.

Entfettung der Milch: Zentrifugieren 3000 r/Min. 20 Min., dann Filtrieren.

Entcaseinisierung: 1/10 n Essigsäure bis pH 4,4, 30 Min. bei 37° C, anschließend Zentrifugieren 3000 r/Min. 10 Min.

(NH₄)₂SO₄-Fällung: Die Globuline werden mit halbgesättigtem Ammoniumsulfat zur Fällung gebracht und zentrifugiert, 5000 r/Min. 10 Min. Das Sediment wird aufgelöst in physiol. NaCl-Lsg. und wieder gefällt zwecks Reinigung, dann wieder aufgelöst und im Eisschrank aufbewahrt.

Die überstehende Flüssigkeit wird mit Amm-sulfat gesättigt, wodurch die Albumine ausfallen. Nach dem Zentrifugieren wird das Sediment in halbgesättigtem Amm-sulfat aufgelöst und zentrifugiert, um eventuelle Globulinreste zum Ausfallen zu bringen, dann die Flüssigkeit gesättigt, zentrifugiert und der Niederschlag in physiol. NaCl-Lsg. aufgelöst.

Na₂SO₄-Fraktionierung: Zur Trennung der von *Howe* und *Palmer* angegebenen Globulin- und Albumin-Fraktionen, wie auch des Caseins, wurde eine neue Fraktionierungsmethode ausgearbeitet. Das Prinzip der bisherigen Methoden ist die Fällung einzelner Fraktionen, entweder direkt mit Salzzugabe oder mittels Dialyse gegen entsprechende Lösungen. Die gefällten Eiweiße werden abfiltriert oder abzentrifugiert und das Filtrat entweder weiter fraktioniert

oder quantitativ im Vergleich mit dem Filtrat der nächsten Salzkonzentration untersucht. Mit dieser Methode ist es aber schwer, Änderungen der Salzkonzentration zu verhüten. Auch steht eine Zentrifuge mit der man bei einer Temperatur über 30°C arbeiten kann, nicht in allen Laboratorien zur Verfügung.

Da die Fällung der Eiweiße mit Na-sulfat ein reversibler Prozeß ist, wurde bei der neuen Methode der umgekehrte Weg wie bisher eingeschlagen. Das ganze Eiweiß wird zur Fällung gebracht und dann die einzelnen Fraktionen mit Salzlösungen von absteigender Konzentration aufgelöst und ausgewaschen.

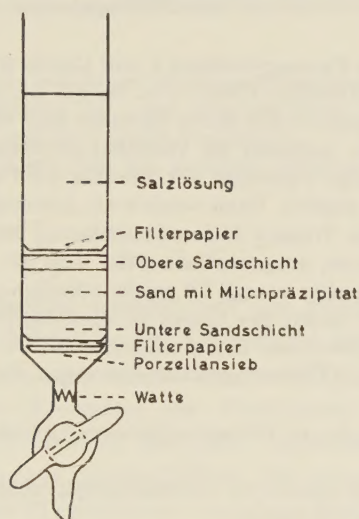


Abb. 1.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: In eine vorgewärmte Chromatographieröhre von 25 ml Inhalt (Abb. 1) wird etwas Watte hineingeschoben, um das Eindringen von Luft unter das Porzellansieb zu verhindern, was ein ungleiches Durchspülen der Säule verursachen würde. Dann werden ca. 2 ml einer 36%-Na-sulfat-Lsg. hineinpipettiert, ein Porzellansieb und ein Filterpapier hineingelegt und die überstehende Flüssigkeit mit feinem Sand (Korngröße 0,17 bis 0,19 mm) bedeckt. Darauf legt man eine dünne Schicht von Na-sulfatpulver, so daß die Milch, die darauf gegossen wird, beim Eindringen in die untere Sandschicht die Salzkonzentration nicht herabsetzt. In die Milch wird jetzt eine Mischung von 0,5 g Na-sulfat und ca. 2 g Sand pro 1 ml Milch gegeben, bis die Milch gerade den ganzen Sand befeuchtet und sich fein in den kapillaren Räumen zwischen den Sandkörnern verteilt. Durch langsames Auflösen des Salzes werden die Eiweiße ausgefällt. Darauf wird noch etwas 36%-Na-sulfat-Lsg. vorsichtig hineinpipettiert, eine dünne Schicht Sand hineingeschüttet und mit einem Filterpapier zugedeckt, um das Aufwirbeln von Sand beim Zugeben von Salzlösungen zu verhindern. Die Löslichkeit von Na-sulfat erreicht bei 20°C 21,5%. Weil aber mit 36%-Lsg. gearbeitet wird, muß alles vorgewärmt werden und die Fraktionierung im Brutschrank bei 37°C erfolgen.

Die gefüllte Säule läßt man 2 Stunden im Brutschrank stehen, was die

Salze zur Auflösung und die Eiweiße zur Ausfällung bringt. Dann wird die Säule mit den von *Howe* und *Palmer* für die Ausfällung angegebenen Na-sulfat-Konzentrationen in umgekehrter Richtung gespült:

mit 36,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	wird Rest-N	entfernt
mit 28,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	werden Albumine C	entfernt
mit 25,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	werden Albumine B	entfernt
mit 22,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	werden Albumine A	entfernt
mit 18,4 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	werden Pseudoglob. II	entfernt
mit 14,2 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	werden Pseudoglob. I u. Casein	entfernt
mit physiol. NaCl-Lsg.	werden Euglobuline	entfernt

Für die Trennung von Pseudoglobulinen I und Casein wurde die Ausflockung des Caseins am Isoelektrischen Punkt, d. h. bei pH 4,4, ausgenutzt. Nach dem Ausspülen der Pseudoglob. II mit 18,4⁰/₀ Na-sulfat wird die Säule mit Na-sulfat gleicher Konzentration, aufgelöst im Phosphat-Citronensäure-Puffer von pH 4,4, gespült. Vollständige Pufferung der Eiweiße wird mit Methylrot in abfließender Flüssigkeit geprüft. Dann werden die Pseudoglob. I mit 14,2⁰/₀ Na-sulfat, das mit einigen Tropfen Citronensäurelösung bis zum Umschlag von Methylrot versetzt wurde, ausgewaschen. Jetzt wird die Säule mit 18,4⁰/₀-Na-sulfat-Lsg. im Veronalpuffer von pH 7,6 wieder alkalisch gemacht (nachweisbar mit Bromthymolblau), damit das Casein in nachfolgender, leicht alkalischer 14,2⁰/₀-Na-sulfat-Lsg. löslich und damit ausspülbar wird.

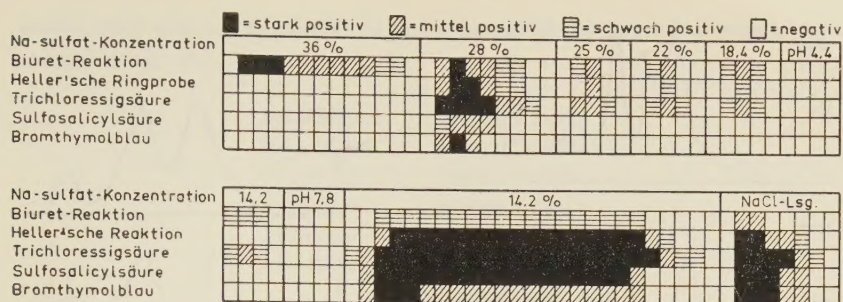
Nach den bisherigen Erfahrungen läßt sich sagen, daß die Menge der Spülflüssigkeit zunimmt:

1. mit der Menge des zu fällenden Eiweißes (jedoch nicht direkt proportional);
2. pro g Eiweiß, je dünner die Chromatographieröhre ist;
3. mit der Größe der Flocken;
4. mit Zunahme der Durchlaufgeschwindigkeit.

Beispiel: Für die Trennung von 1 ml Kuhmilch in alle 7 Fraktionen bei einer Höhe der Eiweißschicht von 1,8 mm in der Säule, Verteilung der Milch zwischen den Sandkörnern von 0,17—0,19 mm Größe und Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/3,5 Min. werden für die einzelnen Fraktionen folgende Spülflüssigkeitsmengen benötigt:

36,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Rest-N	26 ml
28,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Albumine C	18 ml
25,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Albumine B	10 ml
22,0 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Albumine A	10 ml
18,4 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Pseudoglob. II	10 ml
14,2 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Pseudoglob. I	8 ml
14,2 ⁰ / ₀ -Na ₂ SO ₄ -Lsg.	Casein	50 ml
physiol. NaCl-Lsg.	Euglobuline	16 ml

Diese Werte wurden folgendermaßen ermittelt: Jede 2 ml des Filtrates wurden getrennt gesammelt und mit Biuret-Reaktion, 20⁰/₀ Trichloressigsäure, 10⁰/₀ Sulfosalicylsäure, Heller'scher Ringprobe je 0,5 ml und 1 Tropfen mit Bromthymolblau auf Eiweißkörper untersucht.



Die auf diese Weise erhaltenen Milcheiweißfraktionen wurden gegen entionisiertes Wasser dialysiert (je nach ursprünglicher Salzkonzentration, im Durchschnitt 24 Std.) und im Vacuum evaporiert.

Das elektrophoretische Bild der isolierten Fraktionen wird im folgenden Abschnitt geschildert.

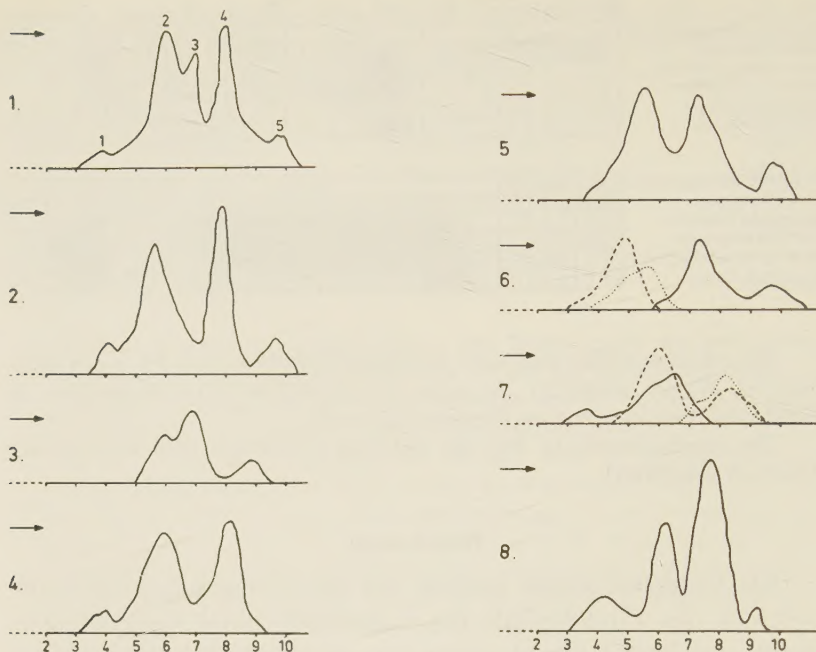
Ergebnisse.

Die Untersuchungen wurden mit der Frauenmilch der Sammelstelle des Kinderspitals der Universität Basel vorgenommen. Zuerst wurden Elektrophoresen der zentrifugierten Milch durchgeführt. Die beste Trennung der Fraktionen wurde mit einem Puffer von pH 8,6 erreicht und alle folgenden Untersuchungen wurden bei diesem pH durchgeführt. Die prozentuale Verteilung der Fraktionen bei Milchproben einzelner Frauen variieren sehr stark.

Maximale und minimale Werte der Milchkurven von 10 Frauen:

Zacke 1	6,0%	0%
Zacke 2	39,8%	32,0%
Zacke 3	19,6%	6,5%
Zacke 4	44,0%	30,0%
Zacke 5	13,0%	2,5%

Die Kurven der Sammelmilch von verschiedenen Tagen zeigten so kleine Unterschiede, daß es erlaubt schien, aus 10 solchen Kurven das Mittel als Standardkurve für die elektrophoretische Lokalisation der einzelnen Fraktionen zu nehmen. Sie zeigt 5 Maxima (Kurve 1), Zacken 1—5. Zacke 1 wurde nicht bei jeder Milchprobe gefunden. Um Näheres über die Natur dieser Maxima zu erfahren, wurde das Casein ausgefällt und beide Komponenten getrennt untersucht. Im Lactoserum (Kurve 2) fehlt die Zacke 3. Casein gibt eine drei-gipflige Kurve (Kurve 3). Ihre erste Zacke



Kurve 1: Entharmte Frauensammelmilch. Kurve 2: Lactoserm Frauensammelmilch. Kurve 3: Casein Frauensammelmilch. Kurve 4: Globuline Frauensammelmilch, ausgesalzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kurve 5: Albumine Frauensammelmilch, ausgesalzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kurve 6: Frauensammelmilch. = Albumine A; ---- = Albumine B; — = Albumine C. Kurve 7: Pseudoglobuline II, Pseudoglobuline I, Euglobuline Frauensammelmilch. = Euglobuline; ---- = Pseudoglobuline I, — Pseudoglobuline II. Kurve 8: Kuhmilch-Lactoserm.

liegt im Bereiche der 2. der Standardkurve, Casein 2 im Bereiche der 3., und Casein 3 am Ende der 4. des Standards. So wird auch die Kurve des Lactoserm verständlich: Ein Kleinerwerden der Zacke 2, Verschwinden der Zacke 3 und eine Vertiefung zwischen 4 und 5. Als nächster Schritt wurde die Trennung des Lactoserm in Albumine und Globuline vorgenommen. Beide Fraktionen zeigen 3gipflige Kurven (K. 4 u. 5), mit Ausnahme jener Proben, bei welchen die Zacke 1 fehlte. Daraus kann man entnehmen, daß die Zacke 1 nur aus Globulinen gebildet wird, die Zacke 5 ausschließlich von Albuminen. Beide mittleren Zacken, 2 u. 4, bestehen aus beiden Komponenten. Die einzelnen Fraktionen der Globuline und Albumine wurden nach der Trennung durch Na-

sulfat mit der oben beschriebenen Methode elektrophoretisch untersucht (K. 6 u. 7):

Euglobuline	zeigten 1 Zacke
Pseudoglob. I	zeigten 2 Zacken
Pseudoglob. II	zeigten 2 Zacken
Albumine A	zeigten 1 Zacke
Albumine B	zeigten 1 Zacke
Albumine C	zeigten 2 Zacken

Die Lokalisation der Zacken wurde mittels Entfernung einzelner Fraktionen aus den Globulinen, bzw. Albuminen, und Vergleich der Kurve des Restes mit denen aller Globuline, bzw. Albumine, gemacht. Um nachzuprüfen, welche von diesen Albuminen mit dem Serumalbumin (*Biserte* et al., 7) verwandt, wenn nicht mit ihm identisch seien, wurde ihre Wanderung in einer Misch-elektrophorese von reinem Blutserumalbumin mit entrahmter Milch, bzw. Milchalbuminen, geprüft. Blutserumalbumin verursachte ausschließlich die Erhöhung der Zacke 5, d. h. die eine Komponente des Albumins C könnte mit dem Serumalbumin verglichen werden.

Ähnliche Untersuchungen wurden mit der Kuhmilch durchgeführt. Diese zeigten, daß die gleichen Na-sulfat-Fractionen beider Milchen sich elektrophoretisch gleich verhalten. Durch beide Fraktionierungsmethoden, die Na-sulfat-Fällung und die Papier-elektrophorese, konnten zwischen Frauenmilch und Kuhmilch keine qualitativen, sondern nur quantitative Unterschiede festgestellt werden. Dies kommt besonders im Aussehen der Kuhmilch-Lactoserum-Elektrophorese zum Vorschein, wo die Zacken 1 u. 4 stark hervortreten (Kurve 8).

Bei der Herstellung von sog. «humanisierter» Kuhmilch, z. B. «Humana», wurden durch partielle Caseinfällung diese quantitativen Eiweißunterschiede z. T. ausgeglichen. Darum ist die Elektrophorese des «Humana»-Laktoserums der der Kuhmilch gleich.

Zusammenfassung.

1. Eine neue Methode der Fraktionierung der Milcheiweiße mit Hilfe von Na-sulfat wurde beschrieben.
2. Die Elektrophorese der entrahmten Frauensammelmilch wurde durchgeführt und das Casein, die durch Na-sulfat-Fällung

gewonnenen drei Albumin- und drei Globulin-Fraktionen lokalisiert.

3. Vergleich der Elektrophoresen von Frauenmilch, Kuhmilch und «Humana» und deren einzelnen Fraktionen ergab, daß durch Aussalzen und elektrophoretische Wanderung keine qualitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Milcheiweißfraktionen gefunden werden.

Summary.

1. A new method of fractionation of milk protein by sodium sulphate is described.

2. The electrophoresis of skimmed breast-milk obtained from a milkbank was performed; the casein and the three albumin- and three globulin fractions obtained by sodium sulphate precipitation were localised.

3. Comparison of the electrophoresis of breast-milk, cow's milk and "Humana" revealed that by precipitation and electrophoretic migration no qualitative differences were found among the fractions of milk protein.

Résumé.

1° Description d'une nouvelle méthode de fractionnement des protéines du lait au moyen du sulfate de sodium.

2° Par électrophorèse, la caséine d'une part et d'autre part les trois fractions-albumines et les trois fractions-globulines obtenues par précipitation par le sulfate de sodium ont été isolées dans un mélange de laits de femmes.

3° La comparaison des courbes électrophorétiques du lait de femme, du lait de vache et du lait « Humana » et de leurs différentes fractions obtenues par précipitation et migration électrophorétique n'a pas révélé de différence qualitative entre les fractions protéiques.

Literatur.

1. Howe, P. E.: The differential precipitation of the proteins of colostrum and a method for the determination of the proteins in colostrum. J. biol. Chem. 52: 51-68 (1922).
2. Palmer, A. H.: The preparation of crystalline globulin from the albumin of cow's milk. J. biol. Chem. 104: 359-372 (1934).

3. *Ivady, J.; Koltay, M.*: Flocculation test for differentiation of human and cow's milk. *Lattante* 26: 65-69 (1955).
4. *Hostettler, H.; Bruderer, G.*: Zur Elektrophorese der Milchproteine. *Schweiz. Milch-Ztg.* 63 (1956).
5. *De Luca, R.; Cutroneo, A.*: Indagini elettroforetiche sulle proteine del latte di donna. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 31: 203-208 (1955).
6. *Narducci, U.; Palazzetti, P.*: Studi elettroforetici sul colostro e sul latte di donna. *Minerva ginec.* 7: 11, 427-430 (1955).
7. *Biserte, G.; Bretona, A.; Fontaine, G.*: Electrophorèse sur papier des protéines du lait de femme. *Archives franç. de Pédiat.* 12: (1), 20-26 (1955).
8. *Heyndrick, G. V.; de Vleeschauwer, A.*: Electrophoretic studies of the milk. *Experientia* 8: 317 (1952).
9. *Schäfer, K. H.*: Elektrophoretische Untersuchungen zum Milcheiweißproblem. *Msschr. Kinderheilk.* 99 (1951).

Adresse des Auteurs: Dr. Jerzy Sikorski, 85, Crescent Street, *Hartford*, Conn. (USA),
